

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Российский биотехнологический университет  
(РОСБИОТЕХ)»**

**Сорбент на основе модифицированной целлюлозы с применением  
адаптивных штаммов *Rhodococcus erythropolis*.**

*Работу выполнил обучающийся*

*11 «Т» класса ГБОУ гор. Москвы «Курчатовская школа»*

*Тазов Сергей*

Москва

## Сорбент на основе модифицированной целлюлозы с применением адаптивных штаммов *Rhodococcus erythropolis*

© Тазов С.М. для корреспонденции : [«serchim164@gmail.com»](mailto:serchim164@gmail.com)

ГБОУ «Курчатовская школа», Москва, ул. М. Конева, д. 10

**Аннотация:** Вследствие или аварий на нефтепроводах, при добыче и транспортировке в России ежегодно теряется около 1,5 млн т нефти. В 80% случаев загрязнению подвергается почва [1]. При загрязнении почвы нефтепродуктами изменяются её физические и морфологические свойства, нарушается воздухообмен, затрудняется поступление воды, питательных веществ, необходимых для жизнедеятельности почвенных животных и растений [2, 3]. Почвы теряют своё плодородие и сельскохозяйственное значение [4, 5]. В качестве нефтеструктора мы планируем применять штамм *R. erythropolis DCL14*, так как он был описан как способный разлагать широкий спектр токсичных соединений, таких как н – алканы и ароматические соединения, мазут и моторное масло, даже в солёных водах и иных экстремальных условиях [22, 31, 32, 10].

### Материалы и методы решения

**1. Физические методы:** первичная уборка с помощью техники и последующая утилизация нефтепродуктов на специализированных предприятиях.

**2. Биоремедиация:** Инокуляция нефтезагрязнённой почвы ризосферными штаммами углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) приводит к изменению её биологических свойств, по сравнению с неинокулированной почвой [27]. При внесении штаммов *R. erythropolis 108*, *A. guillouiae 112*, *A. guillouiae 114* и их консорциума в нефтезагрязнённой почве, как правило, происходит активация оксидоредуктазных ферментов и повышение эмиссии CO<sub>2</sub> [12]. Соответственно, процессы, которые в природных условиях затягиваются на десятилетия, при использовании выделенных нами штаммов УОМ происходят в течение 2 – 3 месяцев и приводят к восстановлению основных биологических свойств почвы. Для ускорения процесса самоочищения в настоящее время применяют углеводородокисляющие микроорганизмы (УОМ), обладающие повышенной способностью к деградации ксенобиотиков [6–8]. Однако многие биопрепараты не способны осуществлять свою жизнедеятельность в условиях крайнего севера, к примеру штамм *A. guillouiae*, выживает при температуре от 10°C до 42°C, оптимальными же температурами для жизнедеятельности данной бактерии являются от 26°C до 28°C [13]. Температурные диапазоны различных штаммов – нефтеструкторов приведены в таблице 1.

Таблица 1. (Температурные режимы штаммов)

Название штамма - нефтеструктора	Температура выживания штаммов	Эффективная температура
<i>Rhodococcus erythropolis 108</i>	От +4 до +37 °C	От +20°C до +35°C
<i>Acinetobacter guillouiae 112</i>	От +10°C до +42 °C	От +25°C до +35°C
<i>Acinetobacter guillouiae 114</i>	От +10°C до +42 °C	От +25°C до +35°C

Rhodococcus erythropolis DCL14 (не адаптированный)	От +4 до +37 °С	От +20°С до +35°С
Rhodococcus erythropolis DCL14 (адаптированный)	От -3 до +37°С	От +2°С до +30°С

**Климат севера Тюменской области:** Для многих штаммов, лимитирующим фактором в условиях севера Тюменской области будет являться температура. К примеру побережье Ямала находится в температурных условиях ниже 0°С, 8 месяцев в год (Рисунок 1) [18]. Это препятствует практическому использованию многих штаммов.

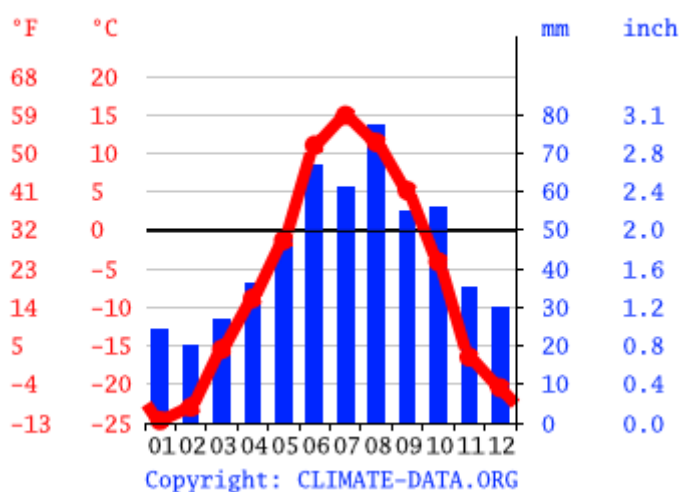


Рисунок 1. Климатическая диаграмма ЯНАО. Ось абсцисс – месяцы. Оси ординат: левая – температура воздуха; правая – количество выпавших осадков.

**Особенности нашего метода биоремедиации:** Большинство биопрепаратов из различных штаммов действуют при температуре от + 4 °С до + 37 °С. Однако климатические условия севера России не позволяют эффективно использовать препараты с вышеуказанной температурой действия. Наш метод предлагает использовать адаптированные штаммы бактерий к конкретным условиям среды, таким как pH, температура, содержание различных ионов. Адаптацию штамма *R. erythropolis* к экстремальным условиям планируем проводить способом поэтапной адаптации. Как только клетки становятся способными расти в условиях, ранее не допускавших роста неадаптированных клеток, их используют для инокуляции свежей среды, инкубированной в более жестких условиях [10]. На рисунке 2 приведены кривые выживаемости штамма *R. Erythropolis*, и его адаптированной версии [10]. По графикам видно, как адаптация (к примеру, по температуре) позволяет расширить зону толерантности. Проводить адаптацию планируем постепенным понижением температуры с постепенным сдвигом по другим лимитирующим факторам (pH, ионы). Для посева клеток микроорганизмов в чашки Петри будем использовать устройство «пуассонер», который обеспечивает более равномерное (пуассоновское) распределение колоний на поверхности питательной среды [19]. Будем использовать среду модифицированного состава Сотона [11].

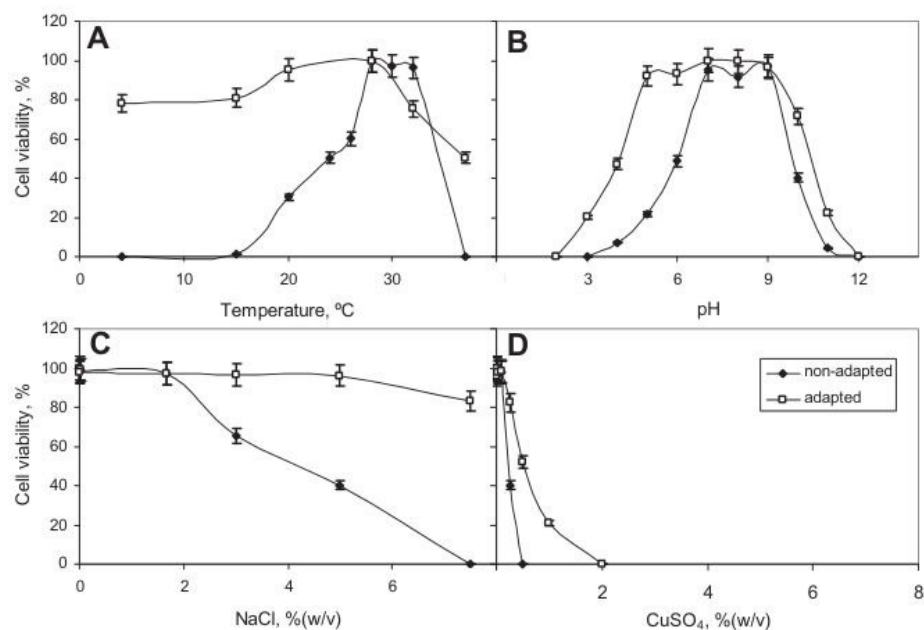


Рисунок 2. Графики выживаемости штаммов в различных условиях.

С целью более эффективного поглощения нефтепродуктов с водной поверхности нами предложено использовать залученные в целлюлозные нити. Так как бактерии сами по себе слабоподвижны и не поплывут в сторону разлива нефтяного пятна сами. С помощью обработанной особым образом целлюлозы нефть будет сорбироваться внутрь структуры полисахарида, а адаптированный штамм *R. Erythropolis* будет проводить метоболическую деструкцию нефтепродуктов. Методология обработки целлюлозы схожа, несмотря на использование различного сырья, содержащего целлюлозу (Растительное сырьё). Используется 1 – 3 % раствор серной кислоты, при температуре приблизительно + 20 °С. Обработка сорбента производится раствором в течении 30 – 60 минут в соотношении соотношение сорбент: раствор кислоты = 1 : 20. По истечении указанного времени контактирования сорбент промывается дистиллированной водой до достижения нейтрального значения pH, после чего модифицированный сорбент проходил стадию сушки до постоянной массы при 70 °С. [33 – 36]. В качестве растительного сырья, содержащего целлюлозу можно использовать початки кукурузы (*Zea mays*) [33], опилки ясеня (*Fraxinus excelsior*) [35]. Или льняную костру (*Linum usitatissimum*) [34, 36]. А также иное растительное сырьё, содержащее целлюлозу в достаточном количестве.

Внесение микроорганизма *R. Erythropolis* в структуру модифицированного целлюлозного сорбента с помощью центрифугирования, на дно пробирки притапливается целлюлозный сорбент и наливается среда с заранее выращенными микроорганизмами.

**Промежуточный этап (подготовка к биоремедиации):** поскольку мы используем для очистки от углеводородов адаптированный штамм *Rhodococcus erythropolis DCL14*, то нам необходимо знать к каким конкретно условиям нужно адаптировать штамм (соленость, pH почв; содержание специфических ионов и т.д.). Для этого будет проведен анализ почвы на содержание тех или иных веществ (на те вещества, которые будут лимитировать рост и развитие штаммов).

**Состав наиболее часто используемой среды для выращивания родококков:** (модифицированная среда Сотона) [11]. В граммах на литр (г/л)

L-аспарагин - 5,0 г/л

Лимонная кислота - 4,0 г/л

Аммоний лимоннокислый двухзамещенный - 2,0 г/л

Калий фосфорнокислый двухзамещенный - 5,0 г/л

Магний сернокислый - 0,5 г/л

Железо сернокислое - 0,05 г/л

Цинк сернокислый - 0,1 г/л

Глицерин - 50,0 г/л

Аммоний азотнокислый - 0,2 г/л

Н-алканы (С. 12 - С. 17) - 20,0 г/л

Вода дистиллированная - До 1л

Реакция рН примерно 7,3 – 7,5, доводится с помощью 25 % раствора аммиака

**3. Экологическая реставрация территории:** После проведения работ по биорекультивации необходимо завершить экологическую реставрацию местности. Самым распространенным методом восстановления почв в сибирском регионе (после окончания добычи угля или рудных ископаемых), является метод зону рекультивации потенциально плодородных почв (суглинков) [14], без использования биологических методик. В случае если на рекультивируемой территории обрыв – необходимо сделать поверхность более пологой, например, как описывает патент [15]. С последующей высадкой на рекультивируемые почвы того фитоценоза, который имел место до разлива нефти.

**Наши рекомендации:** Период «лабораторной» адаптации у приведенного нами штамма, занимает около 2 – 3 месяцев [10], за это время нефтепродукты могут значительно изменить состав почвы и нанести значительный вред экосистемам. Поэтому стоит заранее адаптировать небольшие культуры штаммов на используя условия разных участков севморпути.

**Иные методы адаптации бактерий:** говоря о методах адаптации организмов к экстремальным условиям (по температуре, концентрации ионов, протонов водорода и т.д.) нельзя не упомянуть о методике геной инженерии CRISPR – 9. Однако методы геной инженерии не лишены недостатков. Прежде всего, это известные законодательные ограничения на применение ГМО. Кроме того, некоторые эксперты высказываются против их повсеместного внедрения из-за страха возможных негативных последствий в виде эпидемий, эпизоотий, инвазий, болезней растений.

**Методика мониторинга:** Мониторинг восстановленных экосистем мы планируем осуществлять методами биоиндикации по оценке гомеостаза развития [21]. А также по оценке метаболической активности биообъектов методом DBNG (Detection of Biogenic Nanoparticles Growth / Generation - DBNG). Данный метод может применяться как в биоиндикации, так и в биотестировании [20]. Будем оценивать общее благополучие экосистем, поскольку «приборные» методы измерения зачастую не могут дать объективную оценку состояния экосистемы. Это обусловлено тем, что для разных экосистем ПДК загрязнителей среды могут отличаться от ПДК для человека

**Биобезопасность:** штамм *R. Erythropolis* классифицирован как условно-патогенная бактерия [22], вызывающий инфекции у пациентов с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) или у пациентов, перенесших трансплантацию органов [27,28,29,30]. Безопасен для использования в биоремедиации загрязненных сред, не требует специальных мер предосторожности в области охраны труда в процессе применения и оказывает слабое воздействие на окружающую среду [16], в отличие от *Rhodococcus fascians* — это фитопатогенная бактерия, которая вызывает фасциацию у широкого спектра однодольных и двудольных растений. Эта инфекция приводит к различным порокам развития, начиная от деформации листьев и заканчивая образованием ведьминых метел и листовых галлов. [28], *A. guillouiae* являются условно – патогенными, могут вызывать заболевание у лягушек, для человека безопасны [17].

## Литература

1. Lu L., Yazdi H., Jin S., Zuo Y., Fallgren P.H., Ren Z.J. Enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil using pilot-scale bioelectrochemical systems // *Hazardous Materials*. 2014. V. 274. P. 8–15. (DIO: 10.1016/j.jhazmat.2014.03.060)
2. Laffon B., Pasaro E., Valdiglesias V. Effects of exposure to oil spills on human health: updated review // *Toxicology and Environmental Health. Part B*. 2016. V. 19. P. 105–128. (DIO: 10.1080/10937404.2016.1168730)
3. Shulz M., Fleet D.M., Camphuysen K.C., Schulze – Dieckhoff M., Laursen K. Wadden Sea quality status report: oil pollution and seabirds // *Wadden Sea quality status report*. Wilhelmshaven. Germany: Common Wadden Sea Secretariat, TMAP. 2017. P. 1–13.
4. Сулейманов Р.Р., Т. С. Шорина Т.С. Влияние нефтяного загрязнения на динамику биохимических процессов чернозема обыкновенного (Оренбургская область) // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2012. Т. 14. N 1. С. 240-243.
5. Tiralerdpanich P., Sonthiphan P., Luepromchai E., Pinyakong O. Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis // *Marine Pollution Bulletin*. 2018. V. 133. P. 595–605. (DIO: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.015)
6. Fuentes S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014. V. 11. P. 4781–4794. (DIO: 10.1007/s00253-014-5684-9)
7. Xenia M. Microorganisms metabolism during bioremediation of oil contaminated soils // *Bioremediation & Biodegradation*. 2016. V. 7. P. 1–6.
8. Varjani S.J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons // *Bioresource Technology*. 2017. V. 223. P. 277–286. (DIO: 10.1016/j.biortech.2016.10.037)
9. Третьякова М.С., Беловежец Л.А., Соколова Л.Г., Зорина С.Ю., Маркова Ю.А. Влияние ризосферных бактерий-нефтедеструкторов на биологическое состояние почвы, загрязнённой нефтью // *Теоретическая и прикладная экология*. 2021. N 2. С. 156-162. doi: 10.25750/1995-4301-2021-2-156-162
10. Carla C.C.R. de Carvalho, Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions // *Research in Microbiology*, Vol, 163, I. 2, 2012, P. 125-136 (DIO: 10.1016/j.resmic.2011.11.003)

11. Nuratinov R.A., Efendieva I.V., Verdieva E.A., Caspian Zonal Research Veterinary Institute, 2000, Patent, Russia, application number: 2000113441/13, 05/26/2000 <https://patentimages.storage.googleapis.com/0e/6a/b2/96d1677582a72b/RU2182171C2.pdf> (Дата обращения 29.10.2025)
12. Новоселова Е.И., Киреева Н.А. Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и ее биодиагностическое значение // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 2. С. 4-12. DIO: 10.25750/1995-4301-2009-2-004-012
13. Korshunova T.Yu., Mukhamatdyarova S.R., Loginov O.N., Properties and phylogenetic position of the bacterium ACINETOBACTER SP. IB DT-5.1/1 // Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2013, Vol. 15, No. 3 (5), P. 1645–1648
14. Semina I.S., Androkhanov V.A., Soil and ecological state of young soils on reclaimed sites using coal enrichment waste, Coal chemistry and ecology of Kuzbass, collection of abstracts of reports of the XI International Russian-Kazakh Symposium. Kemerovo, 2022, p. 82 [https://www.elibrary.ru/download/elibrary\\_49862372\\_40919320.pdf](https://www.elibrary.ru/download/elibrary_49862372_40919320.pdf) (Дата обращения 29.10.2025)
15. Protsenko M.M., Popov V.G., Method of reclamation of waste dumps // Patent number: SU 1330312 A1, Patent Office: USSR, 1987.
16. Aoshima H., Hirase T., Tada T., Ichimura N., Kato H., Nagata Y., Myoenzono T, Taguchi M, Takahashi K, Hukuzumi T, Aokiya T., Makino S., Hagiya K., Ishiwata H., Safety evaluation of a heavy oil-degrading bacterium, Rhodococcus erythropolis C2 // The Journal of Toxicological Sciences, 2007 Vol. 32 No. 1 P. 69-78 DOI: ([10.2131/jts.32.69](https://doi.org/10.2131/jts.32.69))
17. Ling Guo 1, Xiyu Jin 1 2, Dan Yang 1, Li Wei 1, Jie Chen 1, Zhihua Lin 1, Li Ma 1, Identification and characterization of Serratia nematophila and Acinetobacter guillouiae from putrid-skin disease lesions in farmed Chinese spiny frog (Quasipaa spinosa) // Microbiol Spectr, Vol. 13 No. 2 P. 2 – 14 (DOI: 10.1128/spectrum.02096-24)
18. [ru.climate-data.org/азия/российская-федерация/ямало-ненецкий-автономный-округ-727/](https://ru.climate-data.org/азия/российская-федерация/ямало-ненецкий-автономный-округ-727/) (Дата обращения 30.10.2025)
19. Khromov-Borisov N.N., Saffi J., Henriques J.A.P., Perfect order plating: principle and applications // Technical Tips Online, 2001, Vol. 6, P. 51 – 57.
20. Складнев Д.А, Сорокин В.В., Коцюрбенко О.Р, Нанобиотехнологический подход к выявлению и исследованию природных микробных сообществ как новый вид экологического мониторинга // Экобиотех, 2023, Том 6, № 3 С. 139-155 (DOI: 10.31163/2618-964X-2023-6-3-139-155)
21. Захаров В.М. Асимметрия животных: популяционно - феногенетический подход // Наука, 1987, с. 216
22. Carla C. C. R. de Carvalho, Sofia S. Costa, Pedro Fernandes, Isabel Couto, Miguel Viveiros, // Membrane transport systems and the biodegradation potential and pathogenicity of genus Rhodococcus
23. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., and Christofi, N. (1998). The genus Rhodococcus. J. Appl. Microbiol. 85, 195–210. doi: 10.1046/j.1365-2672.1998.00525.x



24. Leavy, J.G. and Colwell, R.R. (1990): Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54, 305-315
25. Depuydt, S., Putnam, M., Holsters, M., and Vereecke, D. (2008). "Rhodococcus fascians, an emerging threat for ornamental crops," in *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology*, Vol. 5, ed J. A. Teixeira da Silva (London: Global Science Books), 480-489.
26. Vereecke, D., Burssens, S., Simón-Mateo, C., Inzé, D., Van Montagu, M., Goethals, K., et al. (2000). The *Rhodococcus fascians* - plant interaction: morphological traits and biotechnological applications. *Planta* 210, 241-251. doi: 10.1007/PL00008131
27. Hsueh, P.-R., Hung, C.-C., Teng, L.-J., Yu, M.-C., Chen, Y.-C., Wang, H.-K., et al. (1998). Report of invasive *Rhodococcus equi* infections in Taiwan, with an emphasis on the emergence of multidrug-resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* 27, 370-375.
28. Prescott, J. F. (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 20-34.
29. Topino, S., Galati, V., Grilli, E., and Petrosillo, N. (2010). *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected individuals: case reports and review of the literature. *AIDS Patient Care STDS* 24, 211-222. doi: 10.1089/apc.2009.0248
30. Savini, V., Fazii, P., Favaro, M., Astolfi, D., Polilli, E., Pompilio, A., et al. (2012). Tuberculosis-like pneumonias by the aerobic actinomycetes *Rhodococcus*, *Tsukamurella* and *Gordonia*. *Microbes Infect.* 14, 401-410. doi: 10.1016/j.micinf.2011.11.014
31. de Carvalho, C., and da Fonseca, M. M. R. (2005). The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 715-726. doi: 10.1007/s00253-005-1932-3
32. de Carvalho, C. C. C. R., Fatal, V., Alves, S. S., and da Fonseca, M. M. R. (2007). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to high concentrations of toluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1423-1430. doi: 10.1007/s00253-007-1103-9
33. Чаптарова Е. А., Санатуллова З. Т., Резапова Н. В., Фазуллина А. А., Шайхиев И. Г. Отходы от переработки початков кукурузы (*Zea mays*) в качестве альтернативного нефтесорбента для ликвидации аварийных разливов нефти с водной поверхности // Проблемы сбора, подготовки и транспорта нефти и нефтепродуктов. 2025 Вып. 4 (158). С. 137-150. doi:10.17122/ntj-oil-2025-4-137-150
34. Шайхиев И.Г., Степанова С.В., Фрид С.В., Хасаншина Э.М. Отходы переработки льна в качестве сорбентов нефтепродуктов. Влияние химической обработки на гидрофобность и нефтепоглощение // Вестник Башкирского университета. 2010 Т. 15 № 3 С. 607-609. EDN: MVPHMR.
35. Денисова Т.Р., Шайхиев И.Г., Сиппель И.Я. Увеличение нефтеемкости опилок ясеня обработкой растворами кислот // Вестник технологического университета. 2015 Т. 18 № 17 С. 233-236. EDN: UOSRCN.
36. Шайхиев И. Г., Низамов Р. Х., Степанова С. В., Фридланд С. В. // Вестн. Башкирск. ун-та. 2010. Т. 15. №1. С. 304-306.